

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A61K 45/00, 38/17, G01N 31/22</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/62556</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年12月9日(09.12.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/02952  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年6月2日(02.06.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/170698      1998年6月3日(03.06.98)      JP  <b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 エフェクター細胞研究所 (EFFECTOR CELL INSTITUTE)[JP/JP] 〒153-0041 東京都目黒区駒場4-6-2 メゾン駒場401号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人</b> (米国についてののみ) 金ヶ崎士朗(KANEGASAKI, Shiro)[JP/JP] 〒214-0032 神奈川県川崎市多摩区枋形1-21-2-503 Kanagawa, (JP) 松本良二(MATSUMOTO, Ryoji)[JP/US] 55906 ミネソタ州 ロチェスター 31スト ストリート エヌ イー 402 #348 Minnesota, (US) 平島光臣(HIRASHIMA, Mitsuomi)[JP/JP] 〒761-0322 香川県高松市前田東町505-2 B-404 Kagawa, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title: EOSINOPHIL CHEMOTACTIC FACTOR</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 好酸球走化性因子  <b>(57) Abstract</b> An eosinophil chemotactic factor which is constantly secreted by a T cell clone STO-2 is partly purified and a specific antibody is constructed. By using this antibody, a DNA library originating in the above clone is screened. As a result, it is found that ecalectin, which is a galectin consisting of 323 amino acids, has a specific eosinophil chemotactic activity. Use of this galectin makes it possible to provide drugs having an effect of increasing eosinophils in a tissue and a method for screening compounds inhibiting this effect. Moreover, drugs containing as the main ingredient the compounds inhibiting the effect of increasing eosinophils in a tissue, which are obtained by the above-mentioned screening method, are efficacious as preventives or ameliorating agents for various allergic diseases which are typical delayed inflammations caused by eosinophils, for example, bronchial asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis.		

## (57)要約

T細胞系クローン的一种 ST0-2 が恒常的に分泌している好酸球走化性因子を部分精製し、特異的抗体を作製した。これを用いて、該クローン由来の DNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、323 アミノ酸から成るガレクチンの一種エカレクチンが特異的な好酸球走化性活性を有することを見出した。該ガレクチンを利用することにより、組織内好酸球増多作用を示す薬剤および該作用を阻害する化合物のスクリーニング方法を提供すること可能である。また、該スクリーニング方法を用いて得られる、組織内好酸球増多作用を阻害する化合物を主成分とする薬剤は、好酸球に起因する典型的な遅発型の炎症である多くの気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性の疾患等に対する治療薬、予防薬または改善薬として有効である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルク
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YC ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

### 好酸球走化性因子

#### 技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野、詳しくは好酸球遊走活性を有するタンパク質をコードするDNAに関する。

#### 背景技術

多くの気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性の疾患や、寄生虫感染においては、好酸球による遅発型の炎症が生じることが明らかにされている[Adv. Immunol. 39, 177-253, 1986]。

通常、好酸球は流血中に白血球の一部として少量存在するが、場合によりその数は上昇し、好酸球増多症を呈する場合がある。流血中の好酸球は何らかの原因で組織内に生じた好酸球走化性因子により血管から組織に誘導される。したがって、好酸球増多や走化性に関する因子を解明し、この因子に由来する直接的または間接的な作用を制御することができれば、上記のアレルギー症状の治療につながるものと期待される。

好酸球を遊走させるペプチド性の因子として、試験管内の実験などにより、エオタキシン(eotaxin)、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-5(IL-5)、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-16(IL-16)、ランテス(RANTES)、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-2、MCP-3、MCP-4、C3a、C5a等が報告されている。しかしながら、ほとんどのものは好酸球を特異的に遊走させる活性が低い。この中で好酸球に対する特異性が比較的高い走化性因子として、IL-5とエオタキシンが挙げられるが、IL-5の走化性因子としての活性は非常に弱く、一方、

アレルギー炎症のある局所に見られる、抗原で活性化された T リンパ球からのエオタキシン類の産生は非常に少ないことが知られている。[J. Immunol. 160(1):60-68 1998]

### 発明の開示

本発明は、好酸球走化性を有する、好酸球に特異的な因子を見出すことを課題とする。また、この因子を用いて好酸球の遊走を制御する薬剤をスクリーニングするための系を開発することを課題とする。

本発明者らは、抗原刺激により活性化された T リンパ球より産生される好酸球特異的走化性因子があるものと考え、その探索を行った。その結果、本発明者らはすでに好酸球増多を示したアレルギー患者の末梢 T リンパ球の培養上清が好酸球走化性活性を有することを見い出しており、さらには恒常的に好酸球走化性活性を有する培養上清を産生する T 細胞株 ST0-2 の樹立に成功している [Lymphokine Cytokine Res. 10, 481-486, 1991; Lymphokine Cytokine Res. 11, 331-338, 1992]。本発明者らは、今回この T 細胞株 ST0-2 よりメッセンジャー RNA を抽出し逆転写反応を行い、cDNA 発現ライブラリーを作製した。一方、ST0-2 培養上清よりこの好酸球走化性因子の部分精製を行い、これをウサギに免疫してこの好酸球走化性の活性を吸収する抗体を得た。この抗体を用いて上記 cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングを行い、32 個の抗体反応性のクローンを得た。この 32 クローンを COS 細胞にトランスフェクトし、細胞上清の好酸球走化性活性を調べたところ、3 つの独立したクローンが陽性であることが判明した。この 3 つのクローンに相当する cDNA の全 DNA 塩基配列をサンガー法により決定したところ、これら 3 つのクローンはすべて 323 個のアミノ酸からなる同一の蛋白質をコードしていることが判明した。

この好酸球特異的走化性因子は、cDNA の塩基配列から計算した分子量は 36 キロダルトンで、等電点は 8.1 であった。コンピューターとデータベースを用

いて相同性解析を行ったところ、この cDNA は糖結合蛋白質の一種ガレクチン-9 (galectin-9) に近似していることが明らかになった。ガレクチンとは、一般にガラクトース (ベータガラクトシド) に結合性を有する、チオール要求性のレクチンのことをいう [European Journal of Biochemistry 243, 543-576, 1997]。本発明者らは、ガレクチン-9 に類似したガレクチンであるこの好酸球特異的走化性因子を「エカレクチン」 (ecalectin) と命名した。

本明細書中、「エカレクチン」とは、以下の (a) または (b) のタンパク質のことをいう。

(a) 配列番号：2 のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：2 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、好酸球の走化性を上昇させる活性を有するタンパク質。

すなわち、エカレクチンとは配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるエカレクチンと機能的に同等である、好酸球走化性を上昇させる活性を有するタンパク質のことであり、配列番号：2 に記載のエカレクチンタンパク質のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、好酸球走化性を上昇させる活性を有するタンパク質も含まれる。変異されるアミノ酸の個数は、エカレクチンタンパク質の機能が保持される限り特に制限はないが、通常 50 アミノ酸以内であり、好ましくは 20 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 10 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 3 アミノ酸以内である。また、アミノ酸の変異部位もエカレクチンタンパク質の機能が保持される限り特に制限はない。

また、本明細書中、「エカレクチンをコードする DNA」とは、以下の (a) ～ (e) のいずれかの DNA からなる DNA のことをいう。

(a) 配列番号：1 の塩基配列からなる DNA。

(b) 配列番号：1 の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズし、かつ、好

酸球の走化性を上昇させる活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(c) 配列番号：1の塩基配列からなるDNAと高い相同性を有し、かつ、好酸球の走化性を上昇させる活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(d) 配列番号：2のアミノ酸配列をコードするDNA。

(e) 配列番号：2のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは負荷されたアミノ酸配列からなり、かつ、好酸球を上昇させる活性を有するタンパク質をコードするDNA。

機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを作出する方法としては、様々な変異導入方法が当業者によく知られている。即ち、当業者であれば、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム（宝酒造社、京都）、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発システム（宝酒造社）などを利用することにより、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるエカレクチンタンパク質のアミノ酸を適宜置換するための遺伝子設計などを行い、エカレクチンタンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAを作出することができる。DNAが自然界において変異を起こし、結果的にそのDNAがコードするタンパク質中のアミノ酸に変異が生じることは一般的な現象であるため、エカレクチンと機能的に同等である自然界由来の変異体をコードするDNAも本発明に含まれる。

機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するための方法として、ハイブリダイゼーション技術も頻繁に利用されている。即ち、当業者にとっては、ハイブリダイゼーション技術を用いて、配列番号：1に記載のエカレクチンタンパク質をコードするDNA配列もしくはその一部をプローブとして、相同性の高いDNAを単離することが通常行われる。即ち本発明のDNAには、配列番号：1に記載のエカレクチンタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズし、好酸球走化性を上昇させる活性を有するタンパク質をコードするDNAも含まれる。該DNAには、ヒト以外に、例えば、マウス、ラット、モルモット、ブタ、

ウシ、サル等の哺乳動物や魚類、は虫類等の脊椎動物、昆虫、寄生虫等の無脊椎動物、カビ、大腸菌等の微生物、ハロバクテリウム等の古細菌、タバコやシロイヌナズナ等の植物、バクテリオファージ、アデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスを起源とする DNA が含まれる。機能的に同等なエカレクチンをコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、通常、「60°C、2xSSC、0.1% SDS」程度、さらに好ましくは「65°C、2xSSC、0.1% SDS」程度、さらに好ましくは「65°C、0.2xSSC、0.1% SDS」程度、もっとも好ましくは「68°C、0.2xSSC、0.1% SDS」程度と、ハイブリダイゼーション条件が厳しくなるにつれて高い相同性を有する DNA を得ることができる。本明細書においては、厳しいハイブリダイゼーション条件とは、「65°C、2xSSC、0.1% SDS」より厳しいハイブリダイゼーション条件をさす。なお、本願発明に利用しうる DNA には、配列番号：1 の塩基配列と高い相同性を有し、かつ、好酸球走化性を上昇させる活性を有するタンパク質をコードする DNA も含まれる。高い相同性とは、配列番号：1 に記載の DNA と、通常、50%以上の相同性、好ましくは 70%以上の相同性、さらに好ましくは 85%以上の相同性、さらに好ましくは 95%以上の相同性を有することを指す。なお、相同性の検索は DNASIS（日立ソフトエンジニアリング社）等のプログラムを用いて行うことができる。

cDNA クローンが得られたことにより、エカレクチンの生産は抗原刺激により活性化された T リンパ球からだけではなく、cDNA クローンを導入した培養細胞や昆虫細胞を用いて生産させることも可能となった。エカレクチンと、すでに知られているガレクチン類とのアミノ酸一次配列の対応を図 1 に示した。

エカレクチンはそのレクチンとしての性質を用いてラクトースカラム等で精製することが可能であった。

また本発明者らは、エカレクチンが好中球、リンパ球および単球に対する走化性活性を有しないかまたはきわめて弱いことを明らかにした。一方、エカレクチンの好酸球に対する走化性活性は、これまでに好酸球に特異的な走化性活

性を有する化合物として知られている IL-5 の 4-5 倍であった。

エカレクチンの存在臓器をしらべたところ、肺、胃、小腸などしばしばリンパ球と好酸球がともに存在している器官にその転写産物が見られ、リンパ組織では、脾臓、リンパ節、胸腺、骨髓、胎児肝などに強く発現していることが明らかになった。

また、エカレクチンは末梢白血球にも発現しており、抗原で感作を受けている個体の T リンパ球をその抗原で刺激することにより該 T リンパ球のエカレクチン産生が著しく増加することも明らかになった。

以上の検討の結果、ガレクチンの一種であるエカレクチンが好酸球に極めて特異的な好酸球走化性活性を有する因子であることが明らかとなった。従って、ガレクチンを有効成分として利用することにより、好酸球走化性を上昇させる薬剤を提供することが可能となった。また、ガレクチンが好酸球走化性を上昇させるという本発明の知見をもとに、ガレクチンが好酸球走化性を上昇させる活性を阻害する化合物を有効成分とする薬剤を提供することにより、好酸球の走化性を低下させることが可能となった。発明者らはまた、この薬剤の有効成分となりうる化合物のスクリーニング方法を提供する。すなわち、ガレクチン、好酸球を共存させた場合に比べて、ガレクチン、好酸球に加えて被験化合物を共存させた場合に、好酸球の走化性が低下する被験化合物を選択することにより、好酸球の走化性を低下させる化合物のスクリーニングを行うことができる。すなわち、本発明は以下のものを含む。

- (1) ガレクチンを有効成分とする好酸球の走化性を上昇させるための薬剤。
- (2) ガレクチンの好酸球走化性を上昇させる活性を阻害する化合物を有効成分とする、好酸球の走化性を低下させるための薬剤。
- (3) ガレクチンがエカレクチンである、(1) または (2) 記載の薬剤。
- (4) ガレクチン、好酸球を共存させた場合に比べて、ガレクチン、好酸球に加えて被験化合物を共存させた場合の、好酸球の走化性を観察する工程を含む、



被験化合物が好酸球の走化性を低下させるか否かを判定する方法。

- (5) (a) ガレクチン、好酸球を共存させた場合に比べて、ガレクチン、好酸球に加えて被験化合物を共存させた場合の、好酸球の走化性を観察する工程、
- (b) (a) の工程で走化性が低下した化合物を選択する工程、を含む、好酸球の走化性を低下させる活性を有する化合物のスクリーニング方法。
- (6) ガレクチンがエカレクチンである、(4) または (5) 記載の方法。
- (7) (5) に記載のスクリーニングのための、ガレクチンを含むキット。
- (8) 好酸球をさらに含む、(7) に記載のキット。

図1より明らかなように、ガレクチン類のアミノ酸レベルの相同領域は、少なくとも推定される炭水化物結合領域（図1における太い実線で示される領域が第一の、太い破線で示される領域が第二の炭水化物結合領域をそれぞれ示す）に関しては40～90%以上の相同性を有しており、好酸球表面に存在するガラクトースとこれらの炭水化物結合領域とが結合することが好酸球走化性に関連することが推定される。したがって、本発明に用いるガレクチンとしては、好酸球走化性を有するものであれば、公知のガレクチンを用いても構わないし、新規にガレクチンとして分類される化合物を用いても構わない。ガレクチンとしては、ヒトガレクチン-1、ヒトガレクチン-2、ヒトガレクチン-3、ラットガレクチン-4、ラットガレクチン-5、ヒトガレクチン-6、ラットガレクチン-8、マウスガレクチン-9、ヒトガレクチン-9等が例示できるが、好ましくは、ガレクチンはガレクチン-9として分類されているものであり、さらに好ましくは、エカレクチンである。また、上記いずれのガレクチンとも糖鎖修飾がなされているものであることが好ましく、さらに好ましくは哺乳類型の糖鎖修飾がなされたものであり、もっとも好ましくはヒト型の糖鎖修飾がなされたものである。

ガレクチンを取得し精製するための材料としては、末梢血感作Tリンパ球を

抗原刺激したものを用いることも可能であるが、例えば ST0-2 細胞系のような、ガレクチンを恒常的に生産する細胞を材料として用いることもできる。さらには、ガレクチンをコードする遺伝子を適当なベクターを介して動物細胞、微生物等の宿主細胞に導入発現することにより、組み換え体ガレクチンを作製することが可能であり、このようなガレクチン産生細胞の発現産物を回収して組み換えガレクチンを得ることができる。宿主細胞としては、糖鎖修飾がなされうる細胞が好ましく、さらに好ましくは哺乳類由来の細胞であり、もっとも好ましくはヒト由来の細胞である。

ガレクチンをコードする DNA を含む DNA としては、ガレクチンの構造遺伝子を含むものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノム DNA、ウイルス DNA、化学合成 DNA などが含まれる。cDNA は、例えば、本発明に利用されるガレクチンをコードする DNA の配列（例えば、配列番号：2）を参考にしてプライマーを設計、化学合成し、PCR を行うことにより調製することが可能である。例えば、ゲノム DNA からガレクチンをコードする DNA を調製する場合には、「Qiagen genomic DNA kits」（キアゲン社、ドイツ、ヒルデン）等を用いることが可能である。得られた DNA の塩基配列は、サンガー法などを用いて決定することができる。ガレクチン DNA は、組み換えタンパク質の製造に用いられる他、遺伝子治療などへの応用が考えられる。たとえば、ガレクチン産生遺伝子をターゲットとしてガレクチンの産生を抑制する遺伝子治療を施すことにより、好酸球に起因する典型的な遅発型の炎症である多くの気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性の疾患等に対する遺伝子治療が考えられる。

本発明に有効に使用しうるガレクチン発現用のベクターとしては例えば、ガレクチンを生体内で発現させるためのベクター、組み換えタンパク質を調製するためのベクターなど目的に応じて種々のベクターが用いられうる。本発明のガレクチンを生体内で発現させるため（たとえば遺伝子治療のため）に用いられるベクターとしては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターな

どが挙げられる。また、CMV プロモーター、SV40 プロモーター等の転写プロモーターをガレクチン遺伝子上流に設置したり、コザックのコンセンサス配列を翻訳開始点に設置したり、転写ターミネーターやポリ(A)シグナルをガレクチン構造遺伝子下流に設置したりする等、ガレクチン構造遺伝子を効率的に転写翻訳するための制御因子を適宜設置することも本発明に利用される発現ベクターを構築する際大切である。また、生体の種類によっては、適宜ガレクチン構造遺伝子のコドン使用をその生体に適したものに交換してやることも肝要である。

組み換えタンパク質を調製するためのベクターの場合も、宿主に適合する転写翻訳制御因子を選択してガレクチン構造遺伝子の前後等に設置することが好ましい。また、上記と同様、宿主細胞に応じて、適宜ガレクチン構造遺伝子のコドン使用をその宿主に適したものに交換することも肝要である。例えば大腸菌を宿主として用いる場合には、ガレクチン構造遺伝子のコドンは大腸菌のコドン使用頻度を参考にして交換することが好ましい。宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞等が好適に利用しうる。また、宿主として CHO 細胞、COS 細胞、293 細胞等の哺乳動物細胞系を用いる場合には、リポフェクチン試薬などを用いて発現ベクターを細胞内に導入することも可能である。

本発明において有効に使用しうる形質転換体としては、ガレクチン DNA を含む上述のベクターを染色体外に保持するもの、本発明の DNA が宿主ゲノム内に組み込まれているものなどが含まれるが、ガレクチン DNA が発現可能な状態(誘導発現可能な状態も含む)で細胞内に保持している限り、その存在形態は問わない。ガレクチン DNA を含むベクターが導入される細胞としては特に制限はない。例えば、遺伝子治療目的の場合には、疾患に応じて、種々の細胞を標的細胞として用いることが可能である。また、ガレクチンを製造する目的の場合には、例えば、大腸菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、電気的穿孔法、

熱ショック、リボフェクチン等のカチオン性脂質を利用した導入法等の方法で行うことが可能である。なお、作製した形質転換体を回収し、発現している組み換え体ガレクチンタンパク質を分離、精製する技術は、常法により行うことが可能である。また、ガレクチンはレクチンの一種であるから、例えばラクトースカラム（生化学工業、東京）等を使用することはガレクチンの精製をする際有効である。

ガレクチンを有効成分とする好酸球の走化性を上昇させるための本発明の薬剤は、そのものを試薬、治療薬または予防薬等として直接使用することも可能であるが、好酸球の走化性が上昇する活性を失わない限り経皮吸収剤あるいは経鼻吸収剤等を含む塗布剤もしくは噴射剤、錠剤、顆粒剤、粉末剤又は通常の注射用の水溶液等の形態で使用することもできる。いずれの形態の薬剤も、好酸球の走化性が上昇する活性を失わない限り緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤、溶解補助剤などと配合したり、公知の製剤学的製造法によって一般的に用いられる適当な担体または媒体と配合したりすることが可能である。担体または媒体としては例えば滅菌水、ブドウ糖などを含む等張液、生理食塩水、植物油（例、ゴマ油、オリーブ油）、着色剤、乳化剤（例、コレステロール）、懸濁剤（例、アラビアゴム）、界面活性剤（例、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油系界面活性剤）、溶解補助剤（例、リン酸ナトリウム）、安定剤（例、糖、糖アルコール、アルブミン）または保存剤（例、パラベン）等と適宜組み合わせ、生体に効果的に投与するのに適した注射剤、経鼻吸収剤、経皮吸収剤、経口剤等の医薬用製剤、好ましくは注射剤に調整することができる。例えば、注射剤の製剤としては、凍結乾燥品や、注射用水剤や、浸透圧ポンプに封入した形等で提供できる。このようにして得られる本発明の薬剤は、例えばヒトをはじめとする哺乳動物に対して投与することができる。投与量は、症状などにより差異はあるが、静脈投与の場合、一般的に成人においては、一日につき約 0.001~100mg、好ましくは約 0.01~10mg、より好ましくは約 0.1~1mg で

ある。本薬剤は、例えば組織内好酸球がきわめて少ない患者または疾患部位に適量の好酸球を組織内に移動させるために使用することができる。例えば、癌や悪性腫瘍等の疾患部位に薬剤を投与することにより疾患が縮小すること等に利用されうる。

癌や悪性腫瘍等の疾患部位への薬剤の投与方法としては、外科的手法を用いて疾患部位を露出させ、該疾患部位に本薬剤を直接塗布することも可能であるし、疾患部位が血管近傍である場合には、カテーテルを通して本薬剤を塗布することも可能である。

ガレクチン遺伝子を搭載した遺伝子治療用ベクターを用いて癌や悪性腫の疾患を縮小させることも可能である。具体的には、一般に用いられているレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターやリボソーム等の非ウイルスベクターに転写プロモーターとガレクチン遺伝子とを搭載したものを遺伝子治療用ベクターとして用いる。この遺伝子治療用ベクターを直接疾患部位に投与することも可能であるが、この遺伝子治療用ベクターを導入した培養細胞を疾患部位に移植することも可能である。培養細胞としては、ガレクチン遺伝子の発現が良好なもので、かつ、好適には疾患の宿主に対して免疫原性を示さないもの、最適には疾患部位またはその近傍の細胞を用いることができる。

本薬剤は、またガレクチンの好酸球走化性を上昇させる活性を阻害する化合物をスクリーニングするための試薬として使用することができる。

ガレクチンの好酸球走化性を上昇させる活性を阻害する化合物を有効成分とする、好酸球の走化性を低下させるための薬剤は、そのものを試薬、治療薬または予防薬等として直接使用することも可能であるが、好酸球の走化性を低下させる活性を失わない限り経皮吸収剤あるいは経鼻吸収剤等を含む塗布剤もしくは噴射剤、錠剤、顆粒剤、粉末剤又は通常の注射用の水溶液等の形態で使用することもできる。いずれの形態の薬剤も、好酸球の走化性を低下させる活性

を失わない限り緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤、溶解補助剤などと配合したり、公知の製剤学的製造法によって一般的に用いられる適当な担体または媒体と配合したりすることが可能である。担体または媒体としては例えば滅菌水、ブドウ糖などを含む等張液、生理食塩水、植物油（例、ゴマ油、オリーブ油）、着色剤、乳化剤（例、コレステロール）、懸濁剤（例、アラビアゴム）、界面活性剤（例、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油系界面活性剤）、溶解補助剤（例、リン酸ナトリウム）、安定剤（例、糖、糖アルコール、アルブミン）または保存剤（例、パラベン）等と適宜組み合わせ、生体に効果的に投与するのに適した注射剤、経鼻吸収剤、経皮吸収剤、経口剤等の医薬用製剤、好ましくは注射剤に調整することができる。例えば、注射剤の製剤としては、凍結乾燥品や、注射用水剤や、浸透圧ポンプに封入した形等で提供できる。このようにして得られる本発明の薬剤は、例えばヒトをはじめとする哺乳動物に対して投与することができる。投与量は、症状などにより差異はあるが、静脈投与の場合、一般的に成人においては、一日につき約 0.001~100mg、好ましくは約 0.01~10mg、より好ましくは約 0.1~1mg であり、経口投与の場合、一般的に成人においては、一日につき約 0.001~1000mg、好ましくは約 0.01~100mg、より好ましくは約 0.1~10mg である。本薬剤は、好酸球に起因するアレルギー性疾患を治療し、または予防することが可能である。好酸球に起因するアレルギー性疾患としては多くの気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等の疾患等を例示することができる。

ガレクチンの好酸球走化性を上昇させる活性を阻害する化合物を探索するためには、例えば、文献[Lymphokine Cytokine Res. 10,481-486,1991; Lymphokine Cytokine Res. 11,331-338,1992]に記載の方法を応用することが考えられる。例えば、健常人ボランティアの末梢血からパーコール（ファルマシア社製、ニュージャージー州、ピスカタウェイ）を用いた不連続密度勾配法とこれに続く抗 CD16 免疫グロブリン（DAKO.A.S.社製、デンマーク、グロストラップ）磁気

抗体処理により CD16<sup>+</sup>の好酸球を精製する。ポリビニルピロリドンを含まないメンブレン（5ミクロンの標準ポアサイズ）を介した2層構造のプレートの上層に  $0.5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$  のヒト好酸球を、下層に好酸球が移動する最適濃度のエカレクチンおよび種々の濃度の被験化合物をそれぞれ置き、5%二酸化炭素分圧下、37°Cで1~2時間インキュベートする。その後、2つのプレートを隔てているメンブレンを取り除き、ディフクイック染色液（バクスターヘルスケア社、イリノイ州、マックゴーパーク）中に静置して好酸球を染色し、メンブレンを通り抜けてきた好酸球を顕微鏡下で計測する。このようにして、被験化合物を添加することによって好酸球の走化性が低下する化合物を選抜していくことにより、好酸球走化性を上昇させる活性を阻害する化合物を探索することが可能となる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、エカレクチン cDNA の構造と他のガレクチンの構造とを比較した図である。図中、human ecalectin はヒトエカレクチンを、human galectin-1 はヒトガレクチン-1 を、human galectin-2 はヒトガレクチン-2 を、human galectin-3 はヒトガレクチン-3 を rat galectin-4 はラットガレクチン-4 を、rat galectin-5 はラットガレクチン-5 を、human galectin-7 はヒトガレクチン-7 を、rat galectin-8 はラットガレクチン-8 を、mouse galectin-9 マウスガレクチン-9 を、human galectin-9 はヒトガレクチン-9 をそれぞれ示す。また、アミノ酸は、「生化学辞典第2版」（東京化学同人社、1990年）p.1468 記載の一文字コードで示した。

図2は、A は、エカレクチン転写物の種々の組織での発現量を示す電気泳動像で、1. 脳、2. 心臓、3. 腎臓、4. 脾臓、5. 肝臓、6. 末梢リンパ球、7. 肺、8. 小腸、9. 筋肉、10. 胃、11. 睾丸、12. 胎盤でのエカレクチンの発現を示す。

B は、相対的 RNA 量を測定するための対照実験を示す電気泳動像であり、ブ

ローブとして G3PDH を用いた。

図 3 は、A は、エカレクチン転写物のリンパ組織での発現を表す電気泳動像で、1. 脾臓、2. リンパ節、3. 胸腺、4. 末梢白血球、5. 骨髓、6. 胎児肝でのエカレクチンの発現を示した。

B は、相対的 RNA 量を測定するための対照実験を表す電気泳動像であり、ブローブとして G3PDH を用いた。

図 4 は、A は、エカレクチン転写物の抗原刺激による産生増強を表す電気泳動像である。

B は、相対的 RNA 量を測定するための対照実験を表す電気泳動像であり、ブローブとして G3PDH を用いた。

図 5 は、エカレクチンが濃度依存的に好酸球走化性を有することを表す図である。横軸はエカレクチン濃度を、縦軸はメンブレンの穴を通過して染色された好中球の数を表した。黒丸がエカレクチン、白丸が陰性対照の P B S を用いた場合の結果をそれぞれ表す。

図 6 は、エカレクチンが好中球走化性を有さないことを表す図である。縦軸はメンブレンの穴を通過して染色された好中球の数を表した。

図 7 は、エカレクチンがリンパ球走化性を有さないことを表す図である。縦軸はメンブレンの穴を通過して染色されたリンパ球の数を表した。

図 8 は、リコンビナントエカレクチンが単球走化性を有さないことを表す図である。縦軸はメンブレンの穴を通過して染色された単球の数を表した。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 エカレクチンの部分精製とエカレクチン特異的抗体を有するポリクローナル抗血清の作製



好酸球増多症患者由来 T 細胞をヒト T 細胞白血病ウイルスを用いてトランスフォームして得られた細胞系 ST0-2 [Lymphokine Cytokine Res. 10,481-486,1991] を材料として用いた。FACS 解析により、この細胞系が T 細胞由来であることを確認した。すなわち ST0-2 は、CD2、CD3、CD4、CD5 および CD8 を発現していたが、顆粒球／マクロファージおよび B 細胞のマーカーである CD16、CD19 および Leu7 は発現していなかった。

0.1%のヒト血清アルブミン、100U/ml の IL-2 (徳島リサーチ研究所、徳島)、50 $\mu$ M の 2-メルカプトエタノール、100 $\mu$ g/ml のストレプトマイシン、100U/ml のペニシリンおよび 5 $\mu$ g/ml のファンギゾンを追加した SF-02 無血清培地 (三光純薬、東京) 中で約 72 時間培養した ST0-2 細胞の培養上清を、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液を用いて pH5 に調整した。このようにして得られたコンディション培地 5 リッターを、50mM 酢酸ナトリウム (pH5.0) で平衡化した複数の CM セファロースカラム (ファルマシア社) (2.6 $\times$ 40cm) に通した。これらのイオン交換カラムを平衡化緩衝液でよく洗うことにより、コンディション培地に含まれる主要夾雑タンパク質であるアルブミンを除去した。カラムに吸着した好酸球走化性因子は、0.1M 塩化ナトリウムを含む 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を用いて溶出した。なお、好酸球走化性因子は、[Lymphokine Cytokine Res. 10,481-486,1991; Lymphokine Cytokine Res. 11,331-338,1992]に記載の方法を用いて各フラクションの好酸球走化性活性を測定することにより、この値を指標にして分離、精製を行った。約 300ml の溶出液を 1%グリシン水溶液中で透析し、分離用等電点フォーカシングに供した。pI 7~8 のタンパク質を含有するフラクション 40ml をロトフォアシステム (バイオーラド社、カリフォルニア州、ヘルクレス) 上に回収した。好酸球走化性因子が濃縮されたこの材料をウルトラフィルトレーション装置と YM-5 メンブレン (アミコン社、マサチューセッツ州、レキシントン) を用いることにより約 10 倍に濃縮した。これを PBS 中で透析後、PBS で平衡化した 1 $\times$ 30cm のスーパーロース-12 カラム (ファ

ルマシア社)により分画を行なった。このゲル濾過カラムのキャリブレーションに基づけば、ほとんどの ECA 活性は 30~40 キロダルトンの画分に存在した。好酸球走化性因子が濃縮された画分を、60%飽和の硫酸アンモニウムを用いてタンパク質沈殿させた。この沈殿を 30%硫酸アンモニウムを含む 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に溶解し、同緩衝液で平衡化した 4.6mm×7.5cm の逆相カラム TSK ゲルフェニル-5PW (トーソー社、東京) にて分画した。緩衝液中の硫酸アンモニウムを 30%~0%まで減少させるリニアグラジエント処理を行なった。最終的に得られた活性画分をフロイント完全アジュバントと共にウサギに感作し、何回かのフロイント不完全アジュバント投与後に血清を回収した。これを「抗好酸球走化性因子特異的抗体」を有するポリクローナル抗血清として使用した。

〔実施例 2〕 T 細胞系 ST0-2 より作製した cDNA ライブラリーと、陽性クローンのスクリーニング

ST0-2細胞 cDNA発現ライブラリーの作製は ZAP Express™ cDNA Gigapack cloning kit (ストラタジーン社、カリフォルニア州、ラホヤ) を用いて行なった。すなわち、約 5 $\mu$ g のポリ(A)<sup>+</sup>mRNA を 1×10<sup>8</sup>個の ST0-2細胞より FastTrack RNA isolation kit (インビトロジェン社、カリフォルニア州、サンディエゴ) を用いて回収した。モロニー Maus 白血病ウイルス由来逆転写酵素および 50-mer のオリゴ dT プライマー (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTT TTTTTT-3' ; 内部に制限酵素 XhoI サイトが含まれている ; 配列番号 : 3) を用いて最初の DNA 鎖を生成した。この DNA 鎖生成反応は、cDNA 内の XhoI サイトがメチル化されるべく、5-メチル CTP 存在下で行なった。続いて、EcoRI アダプターをこの cDNA の 5' 末端に連結した。これを制限酵素 XhoI (ストラタジーン社) で切断し、0.1mM EDTA、25mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH7.5) で平衡化した 1ml のセファクリル S-500 HR (ギブコ社) ゲル濾過カラムを用いてサイズ分画した。500bp (ベースペア) 以上の分画をプールし、順次キットのバクテリオファージ発現

ベクター (ZAP Express™) にクローン化した。これをGigapack III Gold extract を用いてファージ粒子に取り込ませた。大腸菌XL-1 Blue MRF' に得られたファージ粒子をトランスフェクトし、約 $1 \times 10^{11}$  pfu/ml (1 mlあたりのブランクフォーミングユニット) のタイターを持つ cDNAライブラリーを得た。このSTO-2細胞 cDNAライブラリーを、picoBlue™ イムノスクリーニングキット (ストラタジーン社) および実施例 1 において得られたヒトエカレクチンに対する抗血清 (約10ng/ml) をプローブとして免疫反応陽性クローンの選抜を行なった。

その結果、32 個の免疫反応陽性クローンを得た。これらのクローンから ExAssist/XL0LR 系 (ストラタジーン社) を使用して、cDNA を哺乳類動物細胞で発現できるベクターpBK-CMV に組み込んだコンストラクトを切り出した。プラスミドミニプレップアイソレーションキット (キアゲン社、カリフォルニア州、サンタクララ) を用いて、これら陽性クローンのプラスミド DNA を精製した。約5 $\mu$ gの精製したこのプラスミドを DEAE-デキストラン法[Mol.Cell.Biol. 4,1641-1643,1984]により COS 細胞にトランスフェクトした。陰性対照用のプラスミドとして、pCMV $\beta$ -galcDNA (ストラタジーン社) を用いた。

トランスフェクタントを、10%胎児牛血清および 50 $\mu$ M の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 培地にて 37°C、3 日間培養しその培養上清を ECA (好酸球走化性) 試験に供した。

好酸球の走化性は、文献[Lymphokine Cytokine Res. 10,481-486,1991; Lymphokine Cytokine Res. 11,331-338,1992]に記載の方法にしたがって測定した。すなわち、健常人ボランティアの末梢血からパーコール (ファルマシア社製、ニュージャージー州、ビスカタウェイ) を用いた不連続密度勾配法とこれに続く抗 CD16 免疫グロブリン (DAKO.A.S.社製、デンマーク、グロストラップ) 磁気抗体処理により CD16<sup>+</sup>の好酸球を精製した。得られた好酸球の純度は 97% 以上であり、生細胞は 95%であった。走化性活性は、ポリビニルピロリドンを含まないメンブレン (5 ミクロンの標準ポアサイズ) を介した 2 層構造の 48

穴プレート（ニューロプローブ社、メリーランド州、キャビンジョーン）を用いて行なった。種々の濃度の走化性因子をプレートの下層に、 $0.5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$  のヒト好酸球を上層にそれぞれ置き、5%二酸化炭素分圧下、37°Cで1~2時間インキュベートした。その後、2つのプレートを隔てているメンブレンを取り除き、ディフクイック染色液（バクスターヘルスケア社、イリノイ州、マックゴパーク）中に静置して好酸球を染色し、メンブレンを通り抜けてきた好酸球を顕微鏡下で計測した。すべてのアッセイは3回ずつ行なった。

陽性対照として、ヒト C5a（シグマ社、ミズーリ州、セントルイス）、IL-5（ジェンザイム社、マサチューセッツ州、ケンブリッジ）、ランテス（ジェンザイム社）およびエオタキシン-1（生化学工業、東京）を用いた。

トランスフェクタントの培養上清を解析したところ、3つのクローンがインビトロの好酸球走化性試験において十分量の ECA 活性を示していた。

### 〔実施例 3〕 塩基配列の決定と解析

実施例 2 で得られた 3 個の独立したクローンの DNA を、サンガー法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74,5463-5467,1997] にて塩基配列を決定したところ、すべて同一のタンパク質をコードしていた。DNA のコンセンサス配列を配列番号：1 に、推定されるアミノ酸配列を配列番号：2 にそれぞれ示した。推定されたオープンリーディングフレームは、配列番号：1 のヌクレオチド番号 60~1028 に相当し、323 個のアミノ酸をコードする 36 キロダルトンのタンパク質をコードしているものと推定された。本発明者らは、クローニングされたこの好酸球走化性因子をエカレクチンと命名した。配列番号：1 のヌクレオチド番号 1576~1581 は典型的なポリアデニレーションシグナルである。このクローンには 5' 非翻訳領域に 59 ヌクレオチド、3' 非翻訳領域に 560 ヌクレオチド以上の配列がそれぞれ存在した。半減期の短い転写産物には 3' 非翻訳領域内に反復配列 (Cell, 46,659-667,1986) がしばしば見られる。エオタキシン-1 や多くのケモカイン類、サイトカイン類の転写産物に見られる "AUUUA" モチーフはエカレ

クチン cDNA の 3' 非翻訳領域内には存在しない。その代わり、4 回繰り返しの "CCCUCC" モチーフが 3' 非翻訳領域内ヌクレオチド番号 1341~1484 に見られる。天然のエカレクチンは分泌タンパク質である。STO-2 由来の転写物から推定されるアミノ酸配列は多くの Phe、Leu および Val 残基を有しているが、分泌タンパク質の多くに見られるアミノ末端疎水性のシグナルペプチドは見られなかった。エカレクチンの pI は 8.1 と推定される。エカレクチンは 4 つの Asn 結合型糖鎖付加可能な部位が配列番号 2 のアミノ酸番号 34、79 および 137 に存在する。

#### [実施例 4] エカレクチンのガレクチンとの相同領域解析

GenBank のホモロジーサーチを用いて、タンパク質および核酸の相同領域の解析を行なった。エカレクチンはこれまでに知られているサイトカイン類またはケモカイン類とは相同性を有しておらず、ガレクチン類 [J. Biol. Chem. 269, 20807-20810, 1994] と相同性を有することが判明した。特に、ヒトおよびマウスに由来するガレクチン-9 [J. Biol. Chem. 272, 6416-6422, 1997; J. Biol. Chem. 272, 6078-6086, 1997] と極めて高い相同性を有していた。図 1 に既に報告されているガレクチン類とエカレクチンとの相同領域を解析した結果を示した。この結果から、エカレクチンはガレクチン類のガレクチン-9 に分類されるタンパク質であるものと考えられた。

#### [実施例 5] エカレクチンの臓器分布

エカレクチンの存在臓器を検討した。種々のヒト臓器より mRNA を取得し、プロット解析により mRNA を発現している臓器を調べた。

種々のヒト臓器由来の、トータル RNA を含むプロット（オリジンテクノロジー社、メリーランド州、ロックビル）またはポリ(A)<sup>+</sup>RNA を含むプロット（クロンテック社、カリフォルニア州、バロアルト）を、放射能標識したエカレクチン cDNA プローブを用いて解析した。プローブと 68°C 2 時間反応させた RNA プロットを、0.1% SDS を含む 2×SSC にて常温で 15 分ずつ 2 回洗浄し、その後 0.1% SDS を含む 0.1×SSC にて 60°C で 30 分ずつ 2 回洗浄した。オートラジオグ

ラフィのイメージは BAS-2000<sup>32</sup>P イメージング装置（富士フィルム社、東京）を用いて解析した。その結果を図2および図3に示した。肺、胃、小腸などリンパ球と好酸球がともに存在している可能性のある器官にその転写産物が見られ（図2A；1．脳、2．心臓、3．腎臓、4．脾臓、5．肝臓、6．末梢リンパ球、7．肺、8．小腸、9．筋肉、10．胃、11．睾丸、12．胎盤でのエカレクチンの発現を示す）、リンパ組織では、脾臓、リンパ節、胸腺、骨髓、胎児肝などに強く発現していることが明らかになった（図3A；1．脾臓、2．リンパ節、3．胸腺、4．末梢白血球、5．骨髓、6．胎児肝でのエカレクチンの発現を示す）。なお、図3の実験に用いたRNAはポリ(A)<sup>+</sup>RNAを使用しているので、トータルRNAを使用した図2の結果よりもRNA量が1000倍近く多くなっている。また、図2Bおよび図3Bは、各レーンにロードしたRNAの相対量を確認するための対照実験であり、用いたプロット（メンブレン）を548bpからなるヒトグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）cDNAプローブと反応させた。

【実施例6】     ダニ抗原に感作されている患者末梢血中T細胞の抗原刺激によるエカレクチンの誘導

エカレクチンは末梢血などTリンパ球を含む組織に発現していることから、Tリンパ球を抗原で刺激した場合にその産生が増加するかどうかを確認する実験を行なった。

ダニ *Dermatophagoides farinae* (Df) 抗原に対して感受性を持つボランティアの末梢血から単核球細胞をフィコール-ハイパック密度勾配遠心により単離した。5×10<sup>6</sup>/mlの細胞を、5%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地または、5%牛胎児血清と5μg/mlのDfを含むRPMI-1640培地でそれぞれ48時間培養した。

トータルRNAをRNeasy Midi kits（キアゲン社）を用いてこれらの細胞から抽出した。約5μgのトータルRNAを変性後、1.4%アガロース／フォルムアミドゲルにて電気泳動を行なった。ゲル内に分離したRNAをHybond<sup>TM</sup>ナイロンメン

ブレン（アマーシャム社、イリノイ州、アーリントンハイツ）にブロットした [Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77,5201-5205,1980]。UV による架橋処理を行なった後、メンブレンを 40  $\mu$ g/ml の変性したサケ精子 DNA（ストラタジーン社）を含む QuickHyb（ストラタジーン社）液で 68°C、30 分の処理を行なった。次に放射能標識したエカレクチンプローブを含む同一の緩衝液中で 2 時間反応させた。各レーンにロードした RNA の相対量を確認するため、用いたブロット（メンブレン）を 548bp からなるヒトグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）cDNA と反応させた。

この結果を図 4A および図 4B に示した。アレルギー患者由来の末梢単核球細胞は、少量のエカレクチン mRNA を産生していたが、この細胞を Df 抗原で 48 時間刺激したものは、50 倍～90 倍もの mRNA を産生するようになった（図 4A）。また、このような抗原刺激を受けた細胞からは、培養液中にエカレクチンが分泌されることが明らかになった。これらのことは、ある特定の抗原に対するアレルギー患者の T リンパ球が、その抗原刺激によりエカレクチンを多量に生産することを強く示唆する。言い換えれば、エカレクチンは特定の抗原に対する過剰な免疫反応であるアレルギーの場で組織における好酸球を増多させるのにきわめて重要な役割を果たしているものと考えられる。

図 4B は各レーンにロードした RNA の相対量を確認するための対照実験であり、実施例 6 に記載の G3PDHcDNA をプローブとして用いた。

#### 〔実施例 7〕 昆虫細胞を用いた組換え体エカレクチンの作製と精製

実施例 2 で得た pBK-CMV に組込んだエカレクチン cDNA を切断分離し、*Spondoptera frugiperda*9(Sf9)昆虫細胞で発現できる pVL1393（ファーマーミンジェン社、カリフォルニア州、サンディエゴ）のポリヒドリン遺伝子プロモーターの下流に接続した。このプラスミドを塩化セシウム-エチジウムブロミド平衡密度勾配超遠心法により精製後 Baculo Gold™ DNA（ファーマーミンジェン社）と共にリン酸カルシウム法で Sf9 細胞に取込ませた。ブランクアッセイ法により、

エカレクチン cDNA を含む baculovirus を同定、分離、増幅し、Sf-9 細胞に再感染させた。感染細胞は 10%熱処理 FCS を含む TNM-FH 培地中で 27°C 3 日間培養し、得られた約  $7 \times 10^6$  細胞をプロテアーゼ阻害剤存在下超音波破壊した。可溶性画分を 1ml のラクトースカラム（生化学工業、東京）にかけ、200mM ラクトース含 TBS 緩衝液で溶出し、単一のバンドに精製された組換え体エカレクチンを回収した。なお、昆虫細胞では、大部分のエカレクチンは細胞内に存在する。

#### 〔実施例 8〕 エカレクチンの好酸球に対する特異的反応性

実施例 2 に記載の走化性を測定する試験方法を用いて、実施例 7 で精製した組換え体エカレクチンが好酸球に対して特異的な走化性を有するかどうかを検討した。その結果を図 5、6、7 および 8 に示した。

陽性対照のエオタキシン-1 と同様にエカレクチンが好酸球走化性を有することが明らかとなった。また図 5 から明らかなように、エカレクチンは強い好酸球走化性を濃度依存的に示した。その最大活性は、好酸球特異的走化性活性を有する IL-5 の最大活性の 4 倍程度であった。

エカレクチンによる走化性の活性が好酸球に特異的なものであるかどうかを確認するため、以下の実験を行った。

実施例 2 に記載の好酸球の走化性試験において、下層に陰性対照として PBS、陽性対照として IL-8、被験化合物としてエカレクチンを静置し、上層には好中球をそれぞれ静置することにより、好中球の走化性試験を行った。この結果を図 6 に示す。縦軸はメンブレンの穴を通過して染色された好中球の数を表した。この結果、エカレクチンは好中球の走化性活性を有さないかまたは極めて小さいことを見いだした。

同様の実験をリンパ球（図 7）および単球（図 8）に関して行った。メンブレンのポアサイズはそれぞれ 3 および 8  $\mu\text{m}$  である。いずれも陰性対照は PBS を用いた。また陽性対照としてはリンフォタクチン、MCP-1 をそれぞれ用いた。縦軸はそれぞれ、メンブレンの穴を通過して染色されたリンパ球および単球の



数を表した。この結果、エカレクチンはリンパ球にも単球に対しても走化性活性を有さないことを見出した。図5、6、7および8の結果より、エカレクチンは好酸球に特異的な走化性活性を有することが見出された。同様の特異性はCOS細胞に発現させたエカレクチンでも認められた。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により好酸球に特異的な走化性活性作用を有する化合物(タンパク質)が提供された。本発明のタンパク質およびDNAを利用することにより、このタンパク質を主成分とする組織内好酸球増多作用を示す薬剤を容易に提供することが可能である。また、組織内好酸球増多作用を阻害する化合物のスクリーニング方法が提供され、そのスクリーニングにより得られる、該作用を阻害する化合物を主成分とする薬剤の提供が可能となった。該薬剤は、組織内好酸球増多に起因する典型的な遅発型の炎症である多くの気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性の疾患等に対する治療薬、予防薬または改善薬として提供可能である。

## 請求の範囲

1. ガレクチンを有効成分とする好酸球の走化性を上昇させるための薬剤。
2. ガレクチンの好酸球走化性を上昇させる活性を阻害する化合物を有効成分とする、好酸球の走化性を低下させるための薬剤。
3. ガレクチンがエカレクチンである、請求項 1 または 2 記載の薬剤。
4. ガレクチン、好酸球を共存させた場合に比べて、ガレクチン、好酸球に加えて被験化合物を共存させた場合の、好酸球の走化性を観察する工程を含む、被験化合物が好酸球の走化性を低下させるか否かを判定する方法。
5. (a) ガレクチン、好酸球を共存させた場合に比べて、ガレクチン、好酸球に加えて被験化合物を共存させた場合の、好酸球の走化性を観察する工程、  
(b) (a) の工程で走化性が低下した化合物を選択する工程、を含む、好酸球の走化性を低下させる活性を有する化合物のスクリーニング方法。
6. ガレクチンがエカレクチンである、請求項 4 または 5 記載の方法。
7. 請求項 5 に記載のスクリーニングのための、ガレクチンを含むキット。
8. 好酸球をさらに含む、請求項 7 に記載のキット。

1/8

1

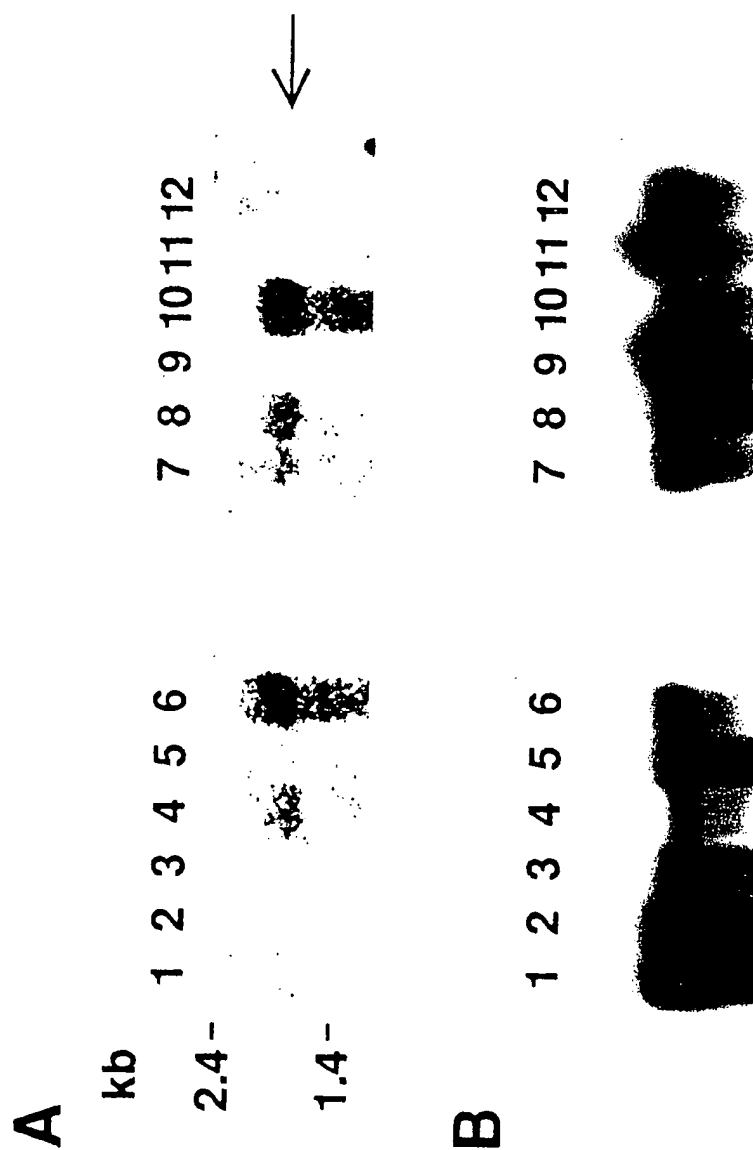
1  
 human ecallectin-1 MAFSSSQAPY LSPAVPFSCT IGGGLQGLQ ITVNGTVLSS SCTRF..AVN FQTGF..SGN DIAFHNPFRF E.DGOY..VV CNTRQNGSMG  
 human galelectin-1 MAC--VASNL NAKP-EC-KV R-EVAPD-KS -VINLGRDS- NLCL- -NAH-DANTI- --SKDG-A--  
 human galelectin-2 WT-E-EVANN DMKP-ST-KI T-SIADGTDG -VINLGGTD KLN- -S...ESTI- --SLDGSN--  
 human galelectin-3 \*P-TGPGY--A GPLI--YNLP LP--VPRML --IL--XFN ANRIA..LDF .....QR-- -V- N-ENNRVI- --KLDNN--  
 rat galelectin-3 MAYVPAGYQ-T YN-TL-YKRP -P--SV-MS -YIO-IANDN MRFRH..VNF AVQGD..E-A D.GWDK... F-M-S-Q--  
 rat galelectin-5 HSN--HKSS LPE-IRP-TV LRIR-L-PPN ASRPH..VNL LCGEE..Q-S -A-L--L D..TSE... F-SKEQ--  
 human galelectin-7 MSL-NL-NII YN-TI-YVS- -TEQ-KP-SL -VIR-H-PKD -ERFO..VDF OHGNSLKPA -V- K.RSNC..I- -LT-EK--  
 rat galelectin-8 --LF-A-S-- IN-II-T-P -----E-- V-LO--T-K- FAQ--..V- -NS--N- -E--K--Q--  
 mouse galelectin-9 ---C-----  
 human galelectin-9

84  
 human ecallectin-1 PEERKTHMPF QKGMFEDLCF LVQSSDFKVM VNGILFVOYF HRVP.FHRVD TISVNGSVOL SYISFOPPGV WPANPAPITQ TVIHTVQSAP  
 human galelectin-1 T-Q-EAVF-- -P-SVAEV-I TFDQANLT-K LPDGYEFKFP N-L-NLEIN YMAAD-DFXI KCVA-D  
 human galelectin-2 Q-Q-ED-LC- SP-SEVKFTV TFE-DK--K LPDGHELTFF N-L-GHSHLS YL--R-GFNM -SPKLE  
 human galelectin-3 R--QSVF-- ES-K-KIQV -EPDH--A -DARLL--N --KKNELIS KLGIS-DID- TSA-YTHI  
 rat galelectin-3 K--K-KS-- --HH-E-V- M-M-EHY--V --L-LQM-T HLQ-D-DLE- OS-N-L-G-Q PA-SQY-G-M -IPAPYSAGY  
 rat galelectin-5 R---GPGV-- -R-Q--EVL IASDDG--AV -GDAQYHFR --L-LA--R LVE-G-D-- DSVRIF  
 human galelectin-7 W--ITHD-- R-EKS-EIVI M-LXNK-H-A --KHILL-A --IN-PEKI- -LCIF-K-NI HS-G-R... FSSDQSHET STLGLTQISK  
 mouse galelectin-8 ---KMQ-- --E-- --R-E-- --KKT--Q --Y-L- -A-S-CLK- -F-T--TQNF R--HO--MA- -T--M-H-T--  
 human galelectin-9 ---R-----  
 human galelectin-9

173  
 human ecallectin-1 GQMFSTPAIP PMNYHPAYP MPFITTLGCG LYPKSKILLS GTVLPSAQRH HINLCSG..N HIAFHLNPRF DENAVVRNTO IDNSWGSEER  
 human galelectin-1  
 human galelectin-2  
 human galelectin-3  
 rat galelectin-4 NPPQNSLPV MAGP-IFNP- V-YVG-LO-- -TARTT-IK -Y--T-KNL I--FKV-STG D--M--I CD.C--SY MRG--  
 human galelectin-5 MSSP STQT-I-NLA V--F-S-PN- -----VI- -V--SD-K- Q--RC--G D--IN--P--  
 rat galelectin-7 ENIQSGKL. ....HLS L--EARLNAS MG-GRTVVVK -E-NTN-TS- NVD-VA-RSR D--L--L NVK-F--SF LQDA--E--  
 mouse galelectin-8 --G-- --VV--T--T I--Y-P-PN- --N--D-T-- --RC--G D--P--N--N--Q--  
 human galelectin-9  
 human galelectin-9

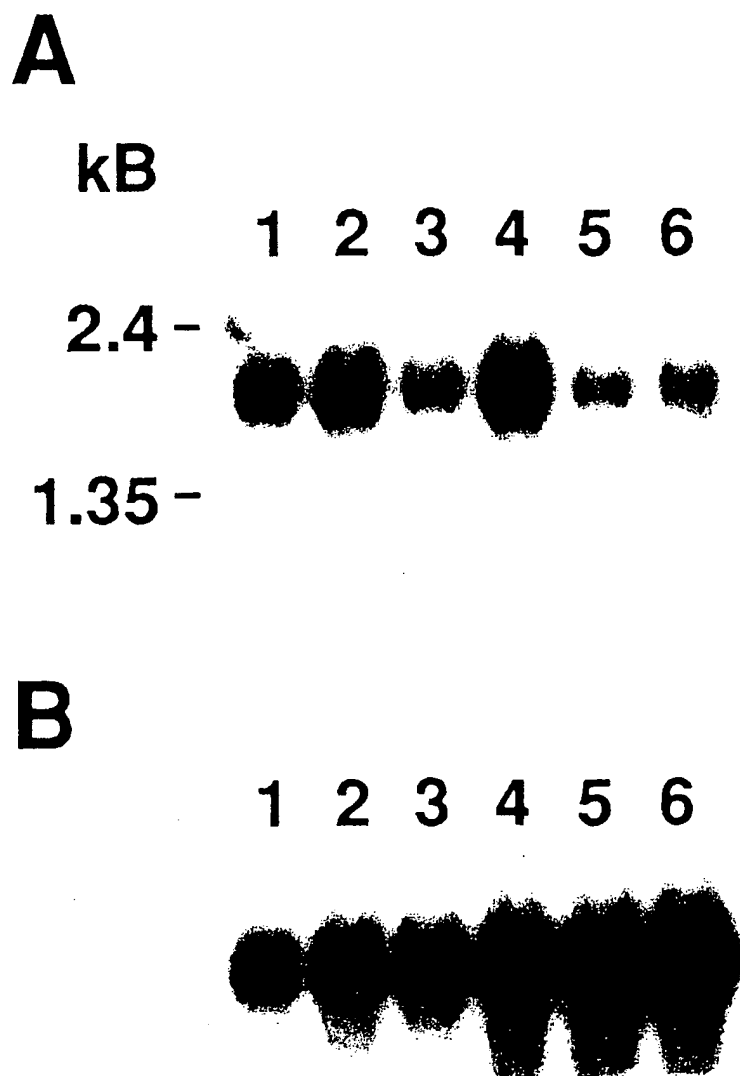
261  
 human ecallectin-1 SLPRKMPFVR GQSFVWILC EAHCLKVAVD GQHLFYYHR LNNLPTINRL EVGGDIQLTH VQT  
 human galelectin-1  
 human galelectin-2  
 human galelectin-3  
 rat galelectin-4 KI-YN--GA --F-DLS-R- GTORE--FAN -----DFS-- PQAFQVDM- -IK--T-SY --I  
 human galelectin-5 ---CS--S-- -R-----G--F-----G--F-----H--D--T--A-----E-  
 human galelectin-7 --T.CF--SS -MY-EMI-Y- DVREF--N -V-SL--K- -FKD-SS-DT- A-D--R-LD RSW  
 mouse galelectin-8 --LGR-----I- -G-F--N -MC-----K--QD--T--A-----  
 human galelectin-9  
 human galelectin-9

2



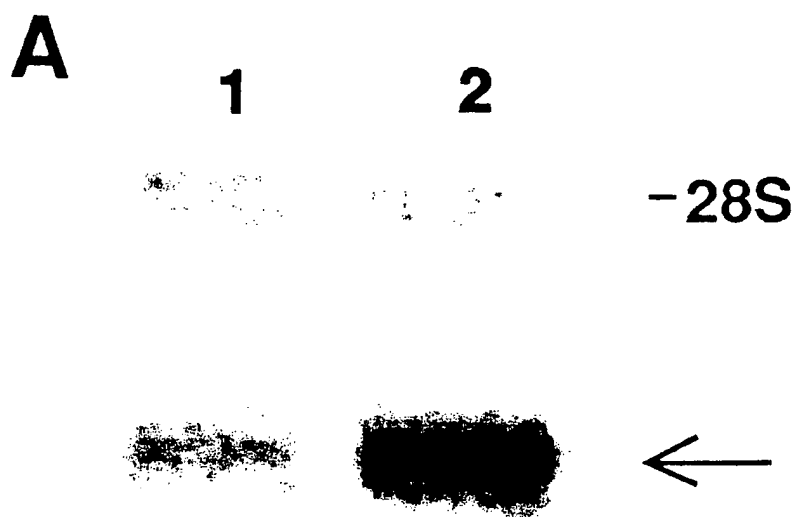
3/8

図 3



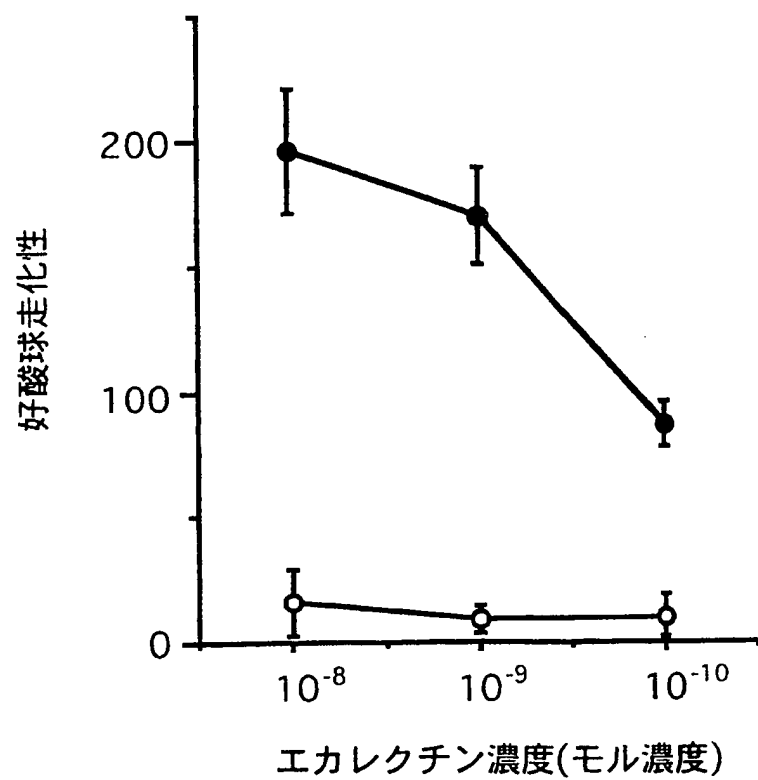
4 / 8

☒ 4



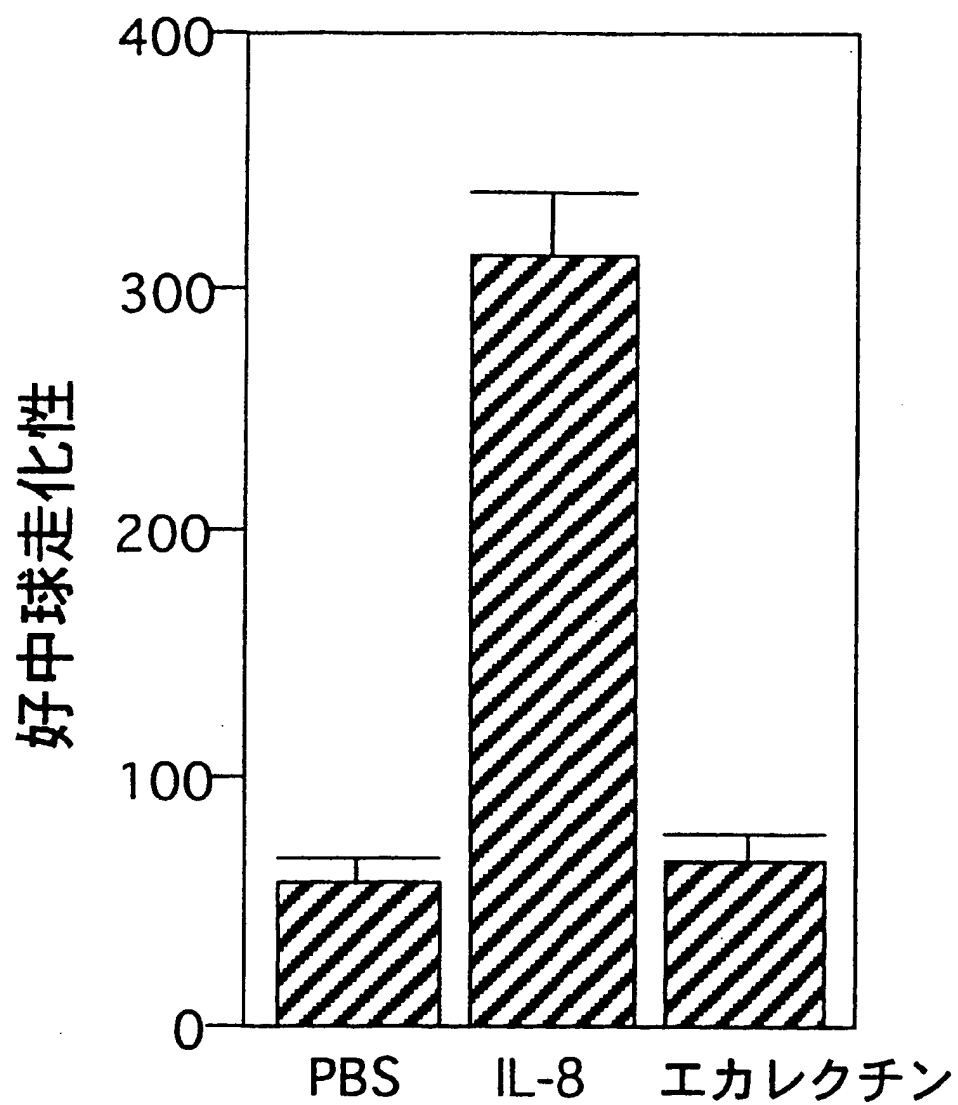
5 / 8

図 5



6 / 8

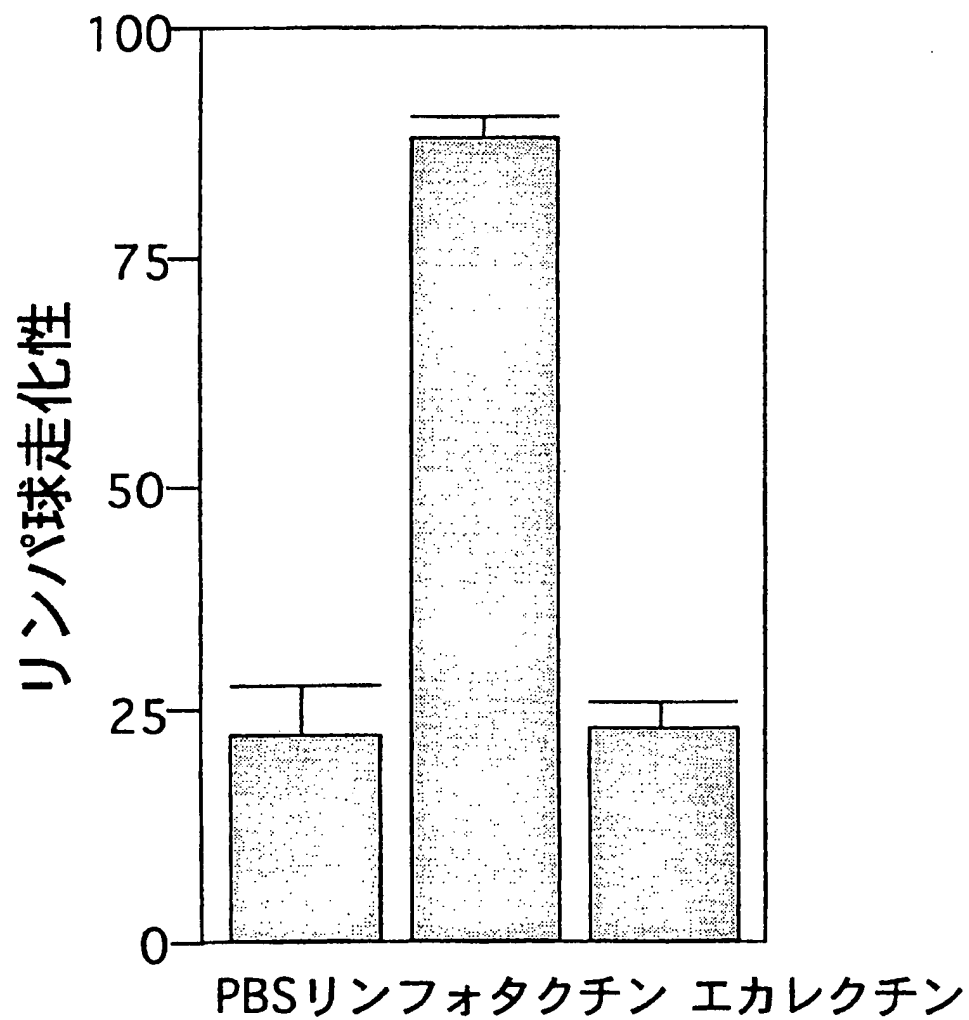
図 6





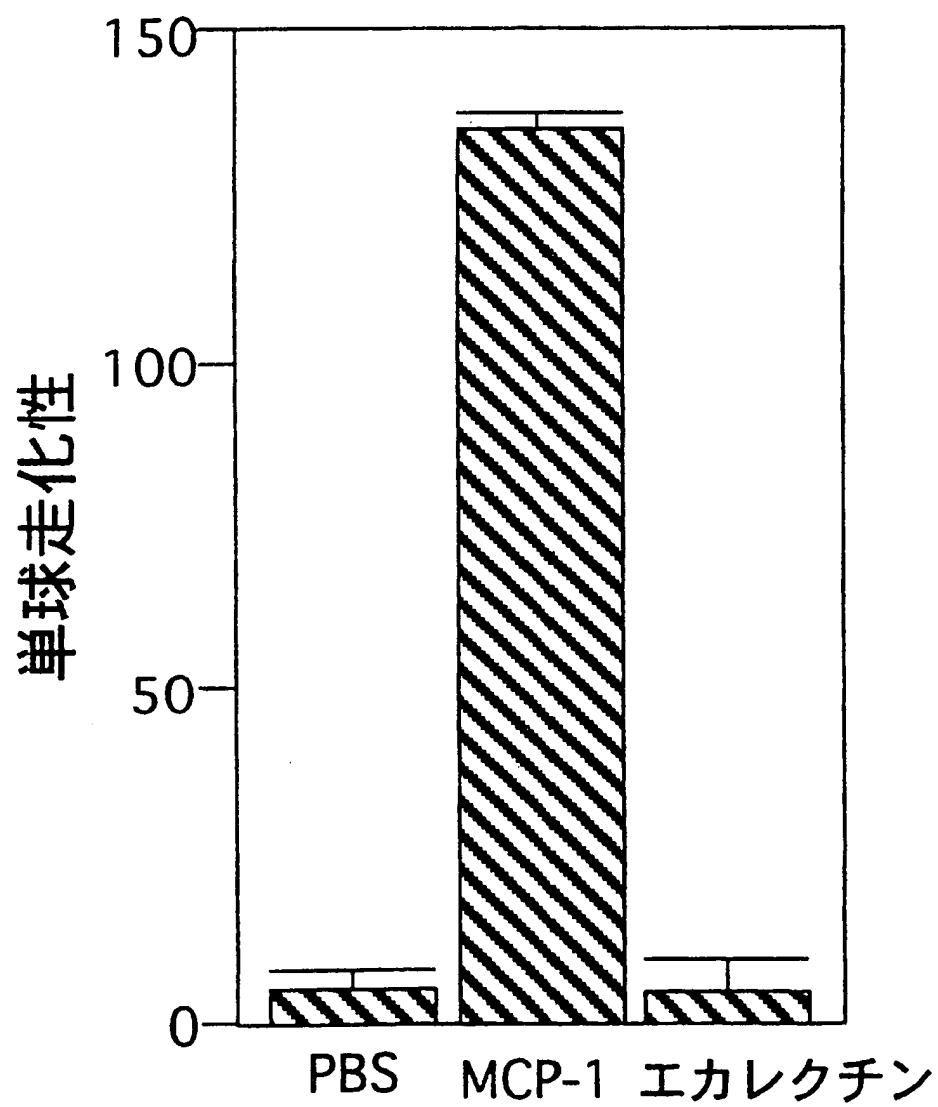
7 / 8

図 7



8/8

図 8



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Kanegasaki, Shiro

金ヶ崎士朗

Matsumoto, Ryoji

松本良二

Hirashima, Mitsuomi

平島光臣

<120> eosinophil chemoattractant

好酸球走化性因子

<130> KAN-001PCT

<140> JP 10-170698

<141> 1998-06-03

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1623

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (60)..(1028)

&lt;400&gt; 1

ctacaaagga cticctagtg ggtgtgaaag gcagcggagg ccacagaggc ggcggagag 59

atg gcc ttc agc agt tcc cag gct ccc tac ctg agt cca gct gtc ccc 107

Met Ala Phe Ser Ser Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro

1 5 10 15

ttt tct ggg act att caa gga ggt ctc cag gac gga ctt cag atc act 155

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr

20 25 30

gtc aat ggg acc gtt ctc agc tcc agt gga acc agg ttt gct gtg aac 203

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn

35 40 45

ttt cag act ggc ttc agt gga aat gac att gcc ttc cac ttc aac cct 251

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro

50 55 60

cgg ttt gaa gat gga ggg tac gtg gtg tgc aac acg agg cag aac gga 299

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly

65                      70                      75                      80

agc tgg ggg ccc gag gag agg aag aca cac atg cct ttc cag aag ggg    347  
Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly

                    85                      90                      95

atg ccc ttt gac ctc tgc ttc ctg gtg cag agc tca gat ttc aag gtg    395  
Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val

                    100                      105                      110

atg gtg aac ggg atc ctc ttc gtg cag tac ttc cac cgc gtg ccc ttc    443  
Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe

                    115                      120                      125

cac cgt gtg gac acc atc tcc gtc aat ggc tct gtg cag ctg tcc tac    491  
His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr

                    130                      135                      140

atc agc ttc cag cct ccc ggc gtg tgg cct gcc aac ccg gct ccc att    539  
Ile Ser Phe Gln Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile

145                      150                      155                      160

acc cag aca gtc atc cac aca gtg cag agc gcc cct gga cag atg ttc    587  
Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe

                    165                      170                      175

tct act ccc gcc atc cca cct atg atg tac ccc cac ccc gcc tat ccg 635

Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro

180

185

190

atg cct ttc atc acc acc att ctg gga ggg ctg tac cca tcc aag tcc 683

Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser

195

200

205

atc ctc ctg tca ggc act gtc ctg ccc agt gct cag agg ttc cac atc 731

Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile

210

215

220

aac ctg tgc tct ggg aac cac atc gcc ttc cac ctg aac ccc cgt ttt 779

Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe

225

230

235

240

gat gag aat gct gtg gtc cgc aac acc cag atc gac aac tcc tgg ggg 827

Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly

245

250

255

tct gag gag cga agt ctg ccc cga aaa atg ccc ttc gtc cgt ggc cag 875

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln

260

265

270

agc ttc tca gtg tgg atc ttg tgt gaa gct cac tgc ctc aag gtg gcc 923

Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala

275

280

285

gtg gat ggt cag cac ctg ttt gaa tac tac cat cgc ctg agg aac ctg 971

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu

290

295

300

ccc acc atc aac aga ctg gaa gtg ggg ggc gac atc cag ctg acc cat 1019

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His

305

310

315

320

gtg cag aca taggcggctt cctggccctg ggcccgggg ctggggtgtg 1068

Val Gln Thr

gggcagtctg ggtcctctca tcaccccccac ttcaggcc cagcctttcc aacctgcct 1128

gggatctggg cttaaatgca gaggccatgt cctgtcttg tctgtcttct ggctacagcc 1188

acctggaac ggagaaggca gctgacggg attgccttcc tcagccgag cagcacctgg 1248

ggctccagct gctggaatcc taccatccca ggaggcaggc acagccaggg agaggggagg 1308

agtgggcagt gaagatgaag cccatgctca gtccctccc atccccacg cagctccacc 1368

ccagtcccaa gccaccagct gtctgtcct ggtgggaggt ggccctctc agccctcct 1428

ctctgacctt taacctcact ctaccttgc accgtgcacc aaccttcac cctcctgga 1488

aagcaggcct gatggcttcc cactggcctc caccacctga ccagagtgtt ctcttcaggg 1548

gactggctcc ttcccagtg tccttaaaat aaagaaatga aaatgcttgt tggcaaaaaa 1608

aaaaaaaaaa aaaaaa 1623

<210> 2

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Phe Ser Ser Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro

1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr

20 25 30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn

35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro

50 55 60



Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly

65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly

85 90 95

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val

100 105 110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe

115 120 125

His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr

130 135 140

Ile Ser Phe Gln Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile

145 150 155 160

Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe

165 170 175

Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro

180 185 190

Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser

195 200 205

Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile

210

215

220

Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe

225

230

235

240

Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly

245

250

255

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln

260

265

270

Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala

275

280

285

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu

290

295

300

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His

305

310

315

320

Val Gln Thr

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gagagagaga gagagagaga actagtctcg agtttttttt tttttttttt

50

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02952

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K45/00, A61K38/17, G01N31/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K45/00, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/15624, A (Human Genome Sciences, Inc.), 16. 04. 98, Particularly page 30, line 15 (Family: none)	1
A	Kimberly D. Dyer, "Eosinophil Charcot-Leyden-Crystal Protein Binds To Beta-Galactoside Sugars", Life Sciences, Vol. 58, No. 23 (1996) P. 2073-2082	1-8
A	Hans-Joachim GABIUS, "Animal Lectins", Eur. J. Biochem., Vol. 243 (1997) P. 543-576	1-8
A	Leonidas D D, "Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins", STRUCTURE, Vol. 3, No. 12 (1995) P. 1379-1393	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later than  
the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority  
date and not in conflict with the application but cited to understand  
the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step  
when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such combination  
being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Date of mailing of the international search report  
14 September, 1999 (14. 09. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02952

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(1) Claim 1 and the part with the citation of claim 1 in claim 3 of the application concerned disclose drugs for enhancing the chemotaxis of eosinophils which contain a galectin as the active ingredient.

(2) Claim 2 and in the part with the citation of claim 1 in claim 3 of the application concerned disclose drugs for depressing the chemotaxis of eosinophils which contain as the active ingredient compounds inhibiting the activity of a galectin of enhancing the chemotaxis of eosinophils. Moreover, claims 4 to 6 of the application concerned disclose methods for screening the compounds employed as the active ingredient in the drug of claim 2, while claims 7 and 8 disclose kits for performing the screening

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02952

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

methods as set forth in claims 4 to 6.

Accordingly, the invention as described in (1) is considered as an invention of medicinal use of different active ingredient being completely opposite to the invention as described in (2). As clearly described in the specification of the application concerned (p. 3, lines 2-6), the galectin employed as the active ingredient in the medicinal use of (1) is a publicly known ingredient. Therefore, it does not appear that there is a technical problem in acquiring an inhibitor of this effect or in applying the galectin to specific medicinal use.

Such being the case, it is considered that an invention different from the invention as described in (1) is disclosed in (2).

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02952

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> A61K45/00, A61K38/17, G01N31/22

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> A61K45/00, A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/15624, A (Human Genome Sciences, Inc.) 16. 04. 98, 特にP. 30第15行目 (ファミリーなし)	1
A	Kimberly D. Dyer, "Eosinophil Charcot-Leyden-Crystal Protein Binds To Beta-Galactoside Sugars", Life Sciences, Vol. 58, No. 23 (1996) P. 2073-2082	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 08. 99

国際調査報告の発送日

14.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hans-Joachim GABIUS, "Animal Lectins", Eur. J. Biochem., Vol. 243 (1997) P. 543-576	1-8
A	Leonidas D D, "Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins", STRUCTURE, Vol. 3, No. 12 (1995) P. 1379-1393	1-8



## 第Ⅱ欄の続き

してみると、(1)の発明は、(2)に記載の発明とは異なる有効成分にかかる正反対の医薬用途の発明と認められる。そして、(1)に記載の医薬用途の有効成分であるガレクチンは、本願明細書のP. 3第2～6行目等の記載からも明らかとおり、公知の成分であるから、その活性の阻害剤を得ることと、当該ガレクチンを特定の医薬用途に適用することに共通の技術的課題があるものとは認められない。

したがって、(2)にかかる発明は、(1)にかかる発明とは異なる発明を記載するものと認める。